

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : T. TANAKA et al.  
Appl. No: : Not Yet Assigned PCT Branch  
Filed : Concurrently Herewith PCT/JP03/10131  
For : METHOD OF JUDGING INFLAMMATORY DISEASE

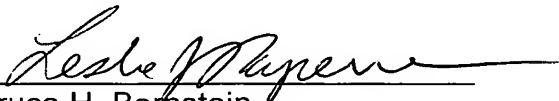
## CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents  
U.S. Patent and Trademark Office  
Customer Service Window, Mail Stop \_\_\_\_\_  
Randolph Building  
401 Dulany Street  
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2002-231532, filed 08 August 2002. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,  
T. TANAKA et al.

  
Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027  
Leslie J. Paperner  
Reg. No. 33,329

February 7, 2005  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1950 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

PCT/JP03/10131

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

08.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 2 年 8 月 8 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 3 1 5 3 2  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 2 - 2 3 1 5 3 2 ]

出 願 人  
Applicant(s):

理化学研究所  
田中 敏博  
大西 洋三  
尾崎 浩一  
飯田 有俊  
堀 正二

REC'D 26 SEP 2003

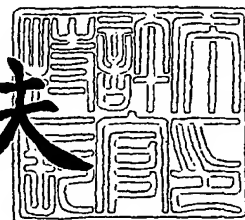
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 9 月 1 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 A21492A

【提出日】 平成14年 8月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都目黒区三田 1-5-6-801

    【氏名】 田中 敏博

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都目黒区八雲 3-29-13-2号

    【氏名】 大西 洋三

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿 3-36-13-307

    【氏名】 尾崎 浩一

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区田尻町 2 1

    【氏名】 飯田 有俊

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1-17-33

    【氏名】 中村 祐輔

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学大学院病態情報内  
科学

    【氏名】 堀 正二

【特許出願人】

    【識別番号】 000006792

    【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都目黒区三田 1-5-6-801

    【氏名又は名称】 田中 敏博

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都目黒区八雲 3-29-13-2号

【氏名又は名称】 大西 洋三

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都渋谷区恵比寿 3-36-13-307

【氏名又は名称】 尾崎 浩一

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区田尻町 21

【氏名又は名称】 飯田 有俊

## 【特許出願人】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘 2-2 大阪大学大学院病態情報内  
科学

【氏名又は名称】 堀 正二

## 【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 炎症性疾患の判定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

【請求項 2】 リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

【請求項 3】 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

(1) 配列番号 1 に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号 2 に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号 3 に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号 4 に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号 5 に示すBAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基におけるG/Cの多型

【請求項 4】 配列番号 1 に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基と配列番号 2 に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基の組み合わせが、G-Aヘテロ接合体であるか、A-Gヘテロ接合体であるか、A-Aホモ接合体であるかを検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

【請求項 5】 配列番号 3 に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 80

番目から 82 番目の塩基の少なくとも一つが他の塩基に置換されることによって、コードされるアミノ酸がスレオニンからアスパラギンに変異する遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

【請求項 6】 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 配列番号 1 から 5 に示される配列における、下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチド。

- (1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位
- (2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位
- (3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部位
- (4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の部位
- (5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の部位

【請求項 8】 配列番号 1 から 5 に示される配列における、下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド。

- (1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位
- (2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位
- (3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部

位

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 5 7 2 番目の部位

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1 2 2 8 番目の部位

【請求項 9】 プライマーがフォワードプライマー及び/又はリバースプライマーである請求項 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】 請求項 7 から 9 のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの 1 種以上を含む、炎症性疾患診断用キット。

【請求項 11】 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の発現状態の分析方法。

(1) 配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 5 7 2 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1 2 2 8 番目の塩基における G/C の多型

【請求項 13】 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性の測定方法。

(1) 配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

【請求項 14】 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 遺伝子断片を細胞に導入し、LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性阻害物質のスクリーニング方法。

(1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

【請求項 15】 請求項 14 に記載のスクリーニング方法により得られる LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性阻害物質。

【請求項 16】 前記 LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する、請求項 13 又は 14 に記載の方法。



【請求項 17】 前記リポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片と LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 の転写制御因子のスクリーニング方法。

(1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す IKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す BAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

【請求項 19】 検出がゲルシフトアッセイにより行われる請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における C/A の多型を含む遺伝子断片を接着分子誘導性細胞に導入し、該細胞の接着分子の誘導化能を評価する方法。

【請求項 21】 前記細胞がヒト冠状動脈平滑筋細胞 (HCASMC) である請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 前記接着分子が血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) 又は E-セレクチンである請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明はL T- $\alpha$  遺伝子等に存在する遺伝子多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

ライフスタイルの変化及び新しい薬理学的アプローチにも関わらず、心筋梗塞を含む冠状動脈疾患は多くの国々において主要な死亡原因となっている(Breslow, J.L., Nature Med.3, 600-601, 1997;Braunwald, E., N.Engl.J.Med., 337, 1360-1369, 1997)。従って、それらの発症における遺伝的及び環境的因子を同定することが強く望まれている。

共通の遺伝的変異は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に罹患する危険性と顕著に関連していることが知られている(Risch, N., et al., Science, 273, 1516-1517, 1996;Collins, F.S., et al., Science, 278, 1580-1581, 1997;Lander, E.S., et al., Science, 274, 536-539, 1996)。多遺伝子性疾患の感受性遺伝子を同定するには、「連鎖」を利用する方法と、「関連」を利用する方法がある。連鎖解析では、疾患感受性遺伝子の座位と遺伝マーカー（主としてマイクロサテライト）の座位が連鎖しているかを検出する、すなわち遺伝子座位間の関係を調べるのに対して、関連解析では特定の遺伝マーカー（主として一塩基多型：SNP）のどの型（アレル：対立遺伝子）が疾患と関連しているかを検出する、つまり対立遺伝子間の関係を調べる。従って、共通の変異をマーカーとして用いる関連解析は疾患関連遺伝子の局在に対する連鎖解析のよりもずっと強力といえる。一塩基多型（SNPs）は、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーとなる。SNPsは、遺伝子産物の質や量に直接影響を与えたり、ある疾患や薬剤による重篤な副作用に対する危険性を増やすことがある。よって、多くのSNPsを探索することにより、疾患関連遺伝子の同定や薬剤による副作用を避ける診断方法の確立に寄与できることを期待される。

#### 【0003】

ヒト染色体6p21上の約130kbの領域には、リンホトキシン- $\alpha$ （LT

— $\alpha$ )、腫瘍壊死因子— $\alpha$  (TNF— $\alpha$ )、LST1、IC7、アログラフト炎症因子-1 (AIF-1: allograft inflammatory-factor-1)、I kappa B-like protein (IKBL)、V-ATPase G-subunit like protein(ATP6G)、BAT1、MICB及びp5-1が存在している。LT— $\alpha$  (TNF— $\beta$ としても知られる)は血管炎症過程の最初の段階に生産されるサイトカインの一つで、 $\beta$ シート構造がサンドイッチ状に重なったホモトリマー構造をとり、インターロイキン-1及び接着分子のような他のメディエーターを誘導することによってサイトカインカスケードを活性する(Ross, R., N.Engl.J.Med., 340, 115-126, 1999)。サイトカインのような炎症メディエーターは、アテローム形成やアテローム性損傷に関与し、管腔内血栓を誘導することが知られている(Ross, R., N.Engl.J.Med., 340, 115-126, 1999)。IKBLは主要組織親和性複合体(NHC)クラスII領域において6p21.3に位置している。IKBLはB細胞における $\kappa$ 軽鎖遺伝子のインヒビター(IKB)ファミリータンパク質に類似していると報告されている。IKBファミリーのタンパク質はB細胞内における $\kappa$ 軽鎖遺伝子エンハンサーの核因子を阻害する作用を有する。

遺伝子変異と心筋梗塞との関係については、これまでヒトプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の遺伝的要因を判定する方法(特開2002-136291号公報)などがある。しかしながら、上記の6p21上の約130kbの領域に存在する遺伝子変異と心筋梗塞との関連についてはこれまで報告はない。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、心筋梗塞と関連性のある遺伝子多型を同定し、その遺伝子多型を利用して心筋梗塞をはじめとする炎症性疾患を判定する方法、該方法に用いることのできるオリゴヌクレオチド、炎症性疾患診断用キットなどを提供することにある。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を解決すべくヒトLT— $\alpha$ 、IKBL、及びBAT1

遺伝子内の SNPs をそれぞれ約1,000人の心筋梗塞患者群と対照群についてマルチプレックスPCR-インベータ法によりタイピングし、患者-対照研究 (case-control study) による関連解析を行った結果、これらの SNPs の頻度が統計学的に有意に心筋梗塞患者で多いことを同定した。さらに、ルシフェラーゼアッセイ法、リコンビナントプロテインを用いた実験により、これらの SNPs が該遺伝子の転写活性に影響を与え、その結果遺伝子産物量が変化し、この変化が心筋梗塞等の疾患を引き起こす可能性を見出した。本発明はかかる知見により完成されたものである。

#### 【0006】

すなわち、本発明によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

#### 【0007】

すなわち、本発明によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

#### 【0008】

本発明によればまた、下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

(1) 配列番号1に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番

目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す BAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

【0009】

本発明によればまた、配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 80 番目から 82 番目の塩基の少なくとも一つが他の塩基に置換されることによって、コードされるアミノ酸がスレオニンからアスパラギンに変異する遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

【0010】

本発明によればまた、配列番号 1 から 5 に示される配列における、前記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、前記判定方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

(1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部位

(4) 配列番号 4 に示す IKB L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の部位

(5) 配列番号 5 に示す BAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の部位

【0011】

本発明によればまた、配列番号 1 から 5 に示される配列における、前記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、前記判定方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

(1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部

位

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部位

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の部位

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の部位

【0012】

さらに、本発明によれば、上記のオリゴヌクレチドの1種以上を含む、炎症性疾患診断用キットが提供される。

【0013】

本発明の別の側面によれば、前記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の発現状態の分析方法が提供される。

【0014】

本発明のさらに別の側面によれば、前記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、I K B L、又はB A T 1 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、I K B L、又はB A T 1 の転写活性の測定方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、I K B L、又はB A T 1 遺伝子断片を細胞に導入し、LT- $\alpha$ 、I K B L、又はB A T 1 の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、I K B L、又はB A T 1 の転写活性阻害物質のスクリーニング方法が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- $\alpha$ 、I K B L、又はB A T 1 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該

細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する、上記いずれかの方法が提供される。

#### 【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、LT- $\alpha$ の転写制御因子のスクリーニング方法が提供される。

#### 【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるC/Aの多型を含む遺伝子断片を接着分子誘導性細胞に導入し、該細胞の接着分子の誘導化能を評価する方法が提供される。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

#### [1] 炎症性疾患の判定方法

本発明の方法は、炎症性疾患と関連性を示す特定遺伝子に存在する遺伝子多型、特には一塩基多型(SNPs)を検出することによって、炎症性疾患の発症の有無、あるいは炎症性疾患の発症の可能性を判定する方法である。

#### 【0018】

上記の特定遺伝子とは、ヒト染色体6p21上の約130kbの領域に存在するリンホトキシン- $\alpha$ (LT- $\alpha$ )遺伝子(配列番号6)、IKBL-like(IKBL)遺伝子(配列番号7)、及びBAT1遺伝子(配列番号8)より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子であって、遺伝子多型は、これらの遺伝子を含むゲノムDNAのエキソン、イントロン、プロモーター部分に存在する。

#### 【0019】

本発明において「リンホトキシン- $\alpha$ (LT- $\alpha$ )遺伝子、IKBL-like(IKBL)遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する遺伝子多型(一塩基多型など)を検出する」とは、(i)当

該遺伝子多型（遺伝子側多型と称する）を直接検出すること、及び(ii)前記遺伝子の相補配列側に存在する遺伝子多型（相補側多型と称する）を検出し、その検出結果から遺伝子側多型を推定することの双方を指すものとする。ただし、遺伝子側の塩基と相補配列側の塩基とが完全に相補的な関係にあるとは限らないという理由から、遺伝子側多型を直接検出することがより好ましい。

#### 【0020】

なお、本発明において検出対象となる相補側多型としては、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子の相補配列、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子の相補配列、及びBAT1 遺伝子の相補配列から選ばれる少なくとも一つの相補配列に存在する遺伝子多型が挙げられ、より具体的には、下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型が挙げられる。

をいう。

(1) LT- $\alpha$  遺伝子の相補配列における、配列番号1に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基に相補的な塩基のC/Tの多型

(2) LT- $\alpha$  遺伝子の相補配列における、配列番号2に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基に相補的な塩基のT/Cの多型

(3) LT- $\alpha$  遺伝子の相補配列における、配列番号3に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基に相補的な塩基のG/Tの多型

(4) IKBL 遺伝子の相補配列における、配列番号4に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基に相補的な塩基のA/Tの多型

(5) BAT1 遺伝子の相補配列における、配列番号5に示すBAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基に相補的な塩基のC/Gの多型

#### 【0021】

本明細書において、遺伝子（例えばLT- $\alpha$  遺伝子）におけるX番目の塩基をその位置を示す数字Xと、塩基を表す記号との組み合わせで示す場合がある。例えば、「10G」とは、10番目の位置にあるGを示し、「10A」とは、10番目の位置にあるAを示し、「10G/A」とは、10番目の位置にあるG又はAを示す。

#### 【0022】



本明細書において配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基は、LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の 1 番目から数えて 252 番目の塩基に相当する。また、配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基は、LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 723 番目の塩基に相当する。

従って、本明細書において配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における G/A 多型は、LT- $\alpha$  イントロン 1 252 G/A と、また配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型は、LT- $\alpha$  エキソン 3 723 C/A と表現する場合がある。

#### 【0023】

本明細書において配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基は、634 番目の塩基を 1 番とした場合に下流方向に向かって 63 番目（-63 番目）の塩基に相当する。また、配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基は、1250 番目の塩基を 1 番とした場合に下流方向に向かって 23 番目（-23 番目）に相当する。

従って、本明細書において配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型は、I K B L プロモーター -63 T/A と、また配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型は、B A T 1 プロモーター -23 G/C と表現する場合がある。

#### 【0024】

例えば、後記表 1 に示すように、配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が G である場合（LT- $\alpha$  エキソン 1 10 G）、配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基が A である場合（LT- $\alpha$  イントロン 1 252 A）、配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基が C である場合（LT- $\alpha$  エキソン 3 723 C）、配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基が A である場合（I K B L プロモーター -63 A）、配

列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1 2 2 8 番目の塩基が G である場合 (B A T 1 プロモーター - 2 3 G) は、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

#### 【0025】

これに対し、配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 1 0 番目の塩基が A である場合 (L T- $\alpha$  エキソン 1 1 0 A)、配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 9 0 番目の塩基が G である場合 (L T- $\alpha$  イントロン 1 2 5 2 G)、配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 8 1 番目の塩基が A である場合 (L T- $\alpha$  エキソン 3 7 2 3 A)、配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 5 7 2 番目の塩基が T である場合 (I K B L プロモーター - 6 3 T)、配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1 2 2 8 番目の塩基が C である場合 (B A T 1 プロモーター - 2 3 C) は、炎症性疾患が発症していない、あるいは発症の可能性が低いと判定できる。

#### 【0026】

また、配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 1 0 番目の塩基と配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 9 0 番目の塩基 (エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 2 5 2 番の塩基) の組み合わせの違い (1 0 G-2 5 2 A ヘテロ接合、1 0 A-2 5 2 G ヘテロ接合、1 0 A-2 5 2 A ホモ接合) によって L T- $\alpha$  発現量が異なる。従って、配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 1 0 番目の塩基と配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 9 0 番目の塩基の組み合わせが、1 0 G-2 5 2 A ヘテロ接合、1 0 A-2 5 2 G ヘテロ接合、1 0 A-2 5 2 A ホモ接合であるかを検出することによっても、炎症性疾患の判定ができる。

例えば後記実施例に示すように、1 0 A-2 5 2 G である場合は炎症のシグナルである L T- $\alpha$  の発現量が有意に多く、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

#### 【0027】

また、配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 8 1 番目の

塩基における C/A の多型は、エキソン 3 中の 26 番目のコドンが変化 (ACC から AAC) することによってスレオニンからアスパラギンへのアミノ酸変異をもたらす。例えば後記実施例に示すように、26 番目のコドンがアスパラギンをコードする場合 (26 N) は、スレオニンをコードする場合 (26 T) より有意に LT- $\alpha$  の発現量が多く、またヒト冠状動脈平滑筋細胞 (HCASMC) において細胞接着因子である血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) や E-セレクトインを誘導することから炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

#### 【0028】

本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断 (罹患危険性の予想)、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。

また、疾患の「判定」は、上記の一塩基多型の検出法による結果と、所望により他の多型分析 (VNTR や RFLP) 及び/又は他の検査結果と合わせて行うこともできる。

#### 【0029】

また、本明細書において、「炎症性疾患」とは、炎症性病態との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定はされないが、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー反応、細菌性ショック、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患などが挙げられ、特には心筋梗塞が挙げられる。

#### 【0030】

(検出対象)

遺伝子多型の検出の対象は、ゲノム DNA が好ましいが、場合によっては (つまり多型部位及びその隣接領域の配列がゲノムと同一または完全相補的になっている場合) cDNA、又は mRNA を使用することもできる。また、上記対象を採取する試料としては、任意の生物学的試料、例えば血液、骨髓液、精液、腹腔液、尿等の体液; 肝臓等の組織細胞; 毛髪等の体毛等が挙げられる。ゲノム DNA 等は、これらの試料より常法に従い抽出、精製し、調製することができる。

#### 【0031】

(増幅)

遺伝子多型を検出するにあたっては、まず遺伝子多型を含む部分を増幅する。増幅は、例えばPCR法によって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法等で行ってもよい。

#### 【0032】

プライマーの選択は、例えば、配列番号1から5に示される配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基、より好ましくは10～50塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅するように行う。

プライマーは、前記の一塩基多型部位を含む所定塩基数の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得る限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでもよい。

#### 【0033】

増幅のために用いるプライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるようにフォワードプライマー又はリバースプライマーの一方が一塩基多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。プライマーは必要に応じて蛍光物質や放射性物質等により標識することができる。

#### 【0034】

(遺伝子多型の検出)

遺伝子多型の検出は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識してもよい。プローブは、前記の一塩基多型部位を含み、被検試料とハイブリダイズし、採用する検出条件下に検出可能な程度の特異性を与えるものである限り何等限定はない。プローブとしては、例えば配列番号1から5に示す配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基の配列、より好ましくは10～50塩基の配列、又はそれらの相補配列にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを用いることができる。また、一塩基多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにオリゴヌクレオチドを選択するのが好ましい。該オ

リボヌクレオチドは、プローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでいてもよい。また、プローブには、RCA (rolling circle amplification)法による増幅に用いられる一本鎖プローブ (パドロックプローブ) のように、ゲノムDNAとアニールし、環状になることによって上記のプローブの条件を満たすプローブが含まれる。

#### 【0035】

本発明に用いるハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジントな条件である。ここで、「ストリンジントな条件」としては、例えば、例えば、モレキュラークロニング・ア・ラボラトリーマニュアル第2版 (Sambrook et al., 1989)に記載の条件等が挙げられる。具体的には、例えば、 $6\times\text{SSC}$  ( $1\times\text{SSC}$ の組成:  $0.15\text{M NaCl}$ 、 $0.015\text{M}$ クエン酸ナトリウム、 $\text{pH } 7.0$ )、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 $5\times$ デンハート及び $100\text{mg/ml}$ ニシン精子DNAを含む溶液中プローブとともに $65^\circ\text{C}$ で一晩保温するという条件等が挙げられる。

#### 【0036】

プローブは、一端を基板に固定してDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型に対応するプローブのみが固定されていても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。

#### 【0037】

遺伝子多型の検出は、制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) により行うこともできる。この方法では、一塩基多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料

の多型を分析する。

#### 【0038】

遺伝子多型の検出は、増幅産物を直接配列決定することによって行ってもよい（ダイレクトシーケンシング法）。配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert法等の公知の方法により行うことができる。

#### 【0039】

遺伝子多型の検出はまた、変性勾配ゲル電気泳動法（D G G E : denaturing gradient gel electrophoresis）、一本鎖コンフォメーション多型解析（S S C P : single strand conformation polymorphism）、対立遺伝子特異的 P C R (allele-specific PCR)、A S O (allele-specific oligonucleotide) によるハイブリダイゼーション法、ミスマッチ部位の化学的切断（C C M : chemical cleavage of mismatches）、H E T (heteroduplex method) 法、P E X (primer extension) 法、R C A (rolling circle amplification) 法等を用いることができる。

#### 【0040】

### [2] 炎症性疾患診断用キット

前記のプライマー又はプローブとしてのオリゴヌクレオチドは、これを含む炎症疾患診断用キットとして提供できる、キットは、上記遺伝子多型の分析法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識、緩衝液等を含んでいてもよい。

#### 【0041】

### [3] L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の発現状態の分析方法

本発明によればまた、前記の（1）から（5）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することによって、L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の発現状態を分析することができる。

例えば、配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が A で、配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基（エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 252 番の塩基）が G である場合（10A-252G ハプロタイプ）は、L T- $\alpha$  の発現量が多いと判断で

きる。これに対し、配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が G で、配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基（エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 252 番の塩基）が A である場合（10G-252A ハプロタイプ）、配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基が A で、配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基（エキソン 1 の 1 番目の塩基から数えて 252 番の塩基）が A である場合（10A-252A ハプロタイプ）は、LT- $\alpha$  の発現量が少ないと判断できる。

#### 【0042】

##### [4] LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 の転写活性の測定方法

本発明によればまた、前記の（1）から（5）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 の転写活性を測定することができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、一塩基多型がプロモーター部位に存在する場合は、その一塩基多型を含む遺伝子断片の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を培養し、レポーター活性を測定すれば、一塩基多型による転写効率に違いを測定することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子が用いられる。

#### 【0043】

##### [5] LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 の転写活性阻害物質のスクリーニング方法

本発明においては、前記の（1）から（5）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む LT- $\alpha$ 、IKBL、又は BAT1 遺伝子断片を細胞

に導入し、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによってLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1転写活性阻害物質をスクリーニングすることできる。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、LT- $\alpha$ の発現量が有意に高いことが認められる一塩基多型（例えば上記10A-252Gハプロタイプ）を有する遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を候補物質の存在下又は非存在下の両方の場合について培養し、候補物質の存在下で培養を行った場合にレポーター活性が下がれば、その候補物質はLT- $\alpha$ 転写活性阻害物質として選択することができる。

#### 【0044】

ここでリポーター遺伝子としては、上記に挙げた遺伝子が用いられる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

#### 【0045】

上記のスクリーニング法により得られるLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性阻害物質もまた本発明の範囲内である。このようなLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性阻害物質は、心筋梗塞治療剤、抗炎症剤、免疫抑制剤などの各種薬剤の候補物質として有用である。

#### 【0046】

#### [6] LT- $\alpha$ 転写制御因子のスクリーニング方法

本発明においてはまた、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少な



くとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することによって、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子をスクリーニングすることができる。前記の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される物質との結合の検出は、ゲルシフト法（電気泳動移動度シフト解析： electrophoretic mobility shift assay, EMSA）、DNase I フットプリント法等によって行うことができるが、ゲルシフト法が好ましい。ゲルシフト法では、タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下するので、 $^{32}\text{P}$ で標識した遺伝子断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常バンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。

#### 【0047】

##### 【実施例】

##### 実施例1（関連性研究）

##### （1）方法

##### ①被験者

一般に、心筋梗塞の診断には、次に挙げる3つの基準のうち2つを必要とする：（1）胸の圧迫、痛み、又は締め付けが30分以上継続する臨床歴、（2）少なくとも一の標準又は二の胸部誘導において0.1mVより大きいST-セグメント上昇、（3）通常の実験値の2倍よりも大きい血清クレアチンキナーゼ濃度における上昇。これらの基準によって心筋梗塞と診断された患者1,133名を被験者とした。心筋梗塞患者の被験者の年齢範囲は28～85才で、平均年齢は62.5才であった。一方、幾つかの医療機関を通じて志願した健常者1,006名を対照とした。対照の被験者の年齢範囲は5才から88才で、平均年齢は38.5才であった。なお、すべての被験者は日本人であった。

#### 【0048】

##### ②SNP発見及びゲノタイピング

全ゲノム関連性研究のために、ウェブサイト (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>) 上で利用できる SNP データベースを用いた。SNP のスクリーニングは既報 (Iida, A., et al., J.Hum.Genet., 46, 668-683, 2001) に従って行った。LT- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、LST1、LC7、アログラフト炎症因子-1 (allograft inflammatory-factor-1 (AIF-1))、I kappa B-like protein (IKBL)、V-ATPase G-subunit like protein (ATP6G)、BAT1、MICB 及び p5-1 を含む約 130 kb の 6p21 上の関連領域 (図 1、上パネル) をスクリーニングした。スクリーニングに先立って、GeneBank データベースからの配列 Y14768、AP000506 及び AC004184 をアセンブリングすることによって約 130 kb の参照配列を作成した。PCR プライマーデザイン、PCR 実験、DNA 抽出、DNA 配列及び SNP 発見のためのプロトコルは Iida, A., et al., J.Hum.Genet., 46, 668-683, 2001 に記載に従った。130 kb 領域における SNP はインベーターアッセイ又は PCR 産物のダイレクトシーケンスによって capillary sequencer (ABI3700, Applied Biosystems) を用いて既報 (Ohnishi, Y., et al., J.Hum.Genet., 46, 471-477, 2001; Iida, A., et al., J.Hum.Genet., 46, 668-683, 2001) に従って行った。

#### 【0049】

#### ③統計学的分析

関連性研究のための統計学的分析、ハプロタイプ頻度及び Hardy-Weinberg 平衡、及び LD 係数 ( $D'$ ) の計算は既報 (Yamada, R., et al., Am.J.Hum.Genet., 68, 674-485, 2001) に従って行った。

#### 【0050】

#### (2) 実験結果

関連性研究の第1のステップとして、ハイスループットマルチプレックス PCR-インベーターアッセイ法 (Ohnishi, Y., et al., J.Hum.Genet., 46, 471-477, 2001) を用いて 94 名の心筋梗塞患者をゲノタイピングし、その結果を健常人集団に見出されるアレル頻度と比較した。約 75,000 の遺伝子をベースとした SNP のスクリーニングの結果、染色体 6p21 上の LT- $\alpha$  遺伝子内にあるひとつの SNP (イントロン 1 ; 252 A>G) の心筋梗塞に対する弱い関連性を

同定することができた ( $\chi^2=9.4$ ,  $p=0.0022$ ; マイナーアレルに対するホモ接合体対その他)。続いて全部で1,133名の心筋梗塞患者と1,006の対照者をゲノタイピングした結果、 $\chi^2$ 値が18.0 ( $p=0.000022$ ; マイナーアレルに対するホモ接合体対その他) 及びオッズ比が1.69 (95%コンフィデンスインターバル (CI); 1.32-2.15、表1) となり、その関連性はずっと顕著になった。これらのデータは、心筋梗塞感受性遺伝子がこの領域内に存在することを示した。

#### 【0051】

LDマッピングのための高密度SNPマップを16名の心筋梗塞患者と16名の対照者からのDNAのダイレクトシーケンシングによって構築した。TNF- $\alpha$ 、LT- $\beta$ 、IkappaB-like protein (IKBL)、及びBAT1 (図1、上パネル) に関連する分子をコードするいくつかの他の分子を含んでいる約130キロボースの6 p 2 1上の関連領域をスクリーニングした。該領域に全部で187個のSNPsを同定し、そして94名の心筋梗塞患者と一般的な集団からの94名の対照を120個のそれらのマーカーに対してゲノタイピングし、エレクトロフェログラム上でヌクレオチドシグナルのピークレベルを比較することによって大まかに推定された約10%以上のアレル頻度に基づいて選択した。最終的に、疾患関連性遺伝子と決定するに十分に高いアレル頻度を有する26 SNPsが (>25%、マイナーアレル)、p5-1及びAIF-1の近くにD' drop offを伴う強いLDの広がりのある一つのブロックを示した (図1、下パネル)。よって心筋梗塞感受性遺伝子がこれらの2つの遺伝子座の間に位置すると結論し、試料サイズを拡大することによってこれらの26個のSNPsをタイピングした。それらのほとんどは心筋梗塞表現型との顕著な関連性は示さなかったが、これらの26個のSNPsのうちの4個は心筋梗塞患者と対照との間でマイナーアレルに対するホモ接合性の頻度を比較したとき、心筋梗塞との強い関連性を表した (表1)。これらのSNPsはLT- $\alpha$ のエキソン1内の10 G>A及びエキソン3内の723 C>A (Thr 26 Asn)、IKBLのプロモーター領域内の-63 T>A、及びBAT1のプロモーター領域内の-23 G>Cであった。4つの全てはほとんど完全に互いに連鎖しており、その領域内の特定のハプロタイプはそれぞれのSNP単独よりも心筋梗塞との関連性に対してより高い統計学的有意差を示した。各S

NPに対するゲノタイプの分布に関するHardy-Weinberg平衡は、患者群と対照群両方に対する $\chi^2$ 試験によって評価し、顕著な偏差を示さなかった( $p > 0.01$ )。これらのSNP遺伝子座はほとんど同じ程度の心筋梗塞との関連性を有しているので、LT- $\alpha$ 、IKBL及びBAT1のすべてが心筋梗塞感受性に影響を及ぼす候補と考えることができた。

【0052】

【表1】

LT- $\alpha$ 、IKBL、及びBAT1における心筋梗塞とSNPsの関連性		OR	
ゲノタイプ	心筋梗塞 (N=1,133)	対照 (N=1,006)	$\chi^2$ [p value] (95%CI)
LT- $\alpha$ exon1 10G>A			
GG	416(36.7%)	378(37.6%)	
GA	504(44.5%)	512(50.9%)	AA vs. GG+GA 1.78
AA	213(18.8%)	116(11.5%)	21.6 [0.0000033] (1.39-2.27)
LT- $\alpha$ intron1 252A>G			
AA	413(36.5%)	371(36.9%)	
AG	511(45.1%)	516(51.3%)	GG vs. AA+AG 1.69
GG	209(18.4%)	119(11.8%)	18.0 [0.000022] (1.32-2.15)
LT- $\alpha$ exon3 723C>A, T26N			
CC	414(36.5%)	374(37.2%)	
CA	506(44.7%)	516(51.3%)	AA vs. CC+CA 1.78
AA	213(18.8%)	116(11.5%)	21.6 [0.0000033] (1.39-2.27)
IKBL promoter -63T>A			
TT	406(35.8%)	374(37.2%)	
TA	521(46.0%)	509(50.6%)	AA vs. TT+TA 1.6
AA	206(18.2%)	123(12.2%)	14.5 [0.000129] (1.25-2.03)
BAT1 promoter -23G>C			
GG	411(36.3%)	374(37.2%)	
GC	517(45.6%)	510(50.7%)	CC vs. GG+GC 1.6
CC	205(18.1%)	122(12.1%)	14.7 [0.000129] (1.26-2.04)

【0053】

実施例2 (LT- $\alpha$ のイントロン1内のSNPによってもたらされる転写活性の増加)

(1) 実験方法

L T- $\alpha$  の-307から268まで、I K B L の-635から15まで、及びB A T 1 の-1231から30までに対応するDNA断片を、ゲノムDNAを鋳型として用いてPCRによって増幅し、pGL3-basic vector (Promega) に5'-3'方向にクローニングした。Jurkut細胞 (RIKEN Cell Bankから入手; RCB0806) は10%ウシ胎児血清を添加したPRMI1640培地内で成長させた。L T- $\alpha$  遺伝子における2つのSNPs、エキソン1内の10G>A及びイントロン1内の252A>Gがその発現レベルに影響を与えるかどうかを決定するために、両方のSNPs (それぞれ10G-252A, 10A-252G及び10A-252Aハプロタイプ) を含むゲノム断片をルシフェラーゼ遺伝子転写ユニットの上流に含む3種のプラスミドを構築した。

上記Jurkut細胞 ( $2 \times 10^6$ ) に、10ugの上記プラスミド構築物と2.5ugのpRL-TKベクター (トランスフェクション効率のための内部制御) をLipoTAXIトランスフェクション試薬 (Stratagene) を用いてトランスフェクトした。6時間後、細胞をPMA (20ng/ml) 及びイソノミシン (1uM) (Sigma) で刺激した。24時間後、細胞を集め、ルシフェラーゼ活性をDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

また、I K B L 及びB A T 1 遺伝子のプロモーター領域におけるSNPsの転写効率に与える影響を同様にして調べた。

#### 【0054】

##### (2) 実験結果

図2Aに示すように、10A-252Gハプロタイプを含むクローンは他の2つのハプロタイプを含むクローンよりも1.5倍の転写活性を示し、エキソンにおける一つの置換ではなく、イントロン1における置換がL T- $\alpha$  遺伝子の転写に影響を与えることを示した。すなわち、心筋梗塞に強い関連性を示すL T- $\alpha$  遺伝子におけるこれら2つのSNPsはその発現レベルに影響を与えることがわかった。

一方、同じく心筋梗塞と顕著な関連性を示すI K B L (-63T>A) のプロモーター領域におけるSNPは転写活性の適度な減少が認められた(図2B)。

I K B L はIkBファミリーのメンバーで、NF kappaB (NF- $\kappa$ B) /rel potei

nのような転写因子に対する阻害分子である (Albertella, M.R., et al., Hum.Mol.Genet., 3, 793-799, 1994)。LT- $\alpha$ プロモーター領域におけるDNA配列はNF- $\kappa$ B, SP-1及びAP-1/c-fos/junを含む数種の核因子に対する結合モチーフを含むという事実から判断すると (Messer, G. et al., J.Exp.Med., 173, 209-219, 1991)、IKBLはこれらの核因子の阻害を通じてLT- $\alpha$ の転写を制御すると考えられる。

#### 【0055】

実施例3 (LT- $\alpha$ のイントロン1に対する未知の核因子の結合)

##### (1) 実験方法

Jurkat細胞からの核抽出物が252A又は252Gアレルを含むゲノム配列に対応するオリゴヌクレオチドに結合できるかどうかを調べた。Andrews, N.C. et al., Nucleic Acid Res., 11, 2499, 1991に記載したように、Jurkat細胞から調製した核抽出物をジオキシゲニン(DIG)-11-ddUTPにて標識した33bpのオリゴヌクレオチドとDIG-gel shift kit (Roche)を用いてインキュベートした。競合研究のために、未標識のオリゴヌクレオチド(100倍過剰)をDIG-標識オリゴヌクレオチドの添加前に核抽出物と前培養した。タンパク質/DNA複合体を0.5×TBE/ホウ酸/EDTA (TBE)緩衝液中、未変性7%ポリアクリルアミドゲル上で分離した。ゲルをニトロセルロース膜に移し、シグナルの検出を化学発光検出システム (Roche)を用いて製造者の指示に従って行った。

#### 【0056】

##### (2) 実験結果

図3に示すように、Gアレルに対応するオリゴヌクレオチドを用いたとき現れるバンドはAアレルに対応するバンドよりも強く、これはJurkat細胞に存在する幾つかの核因子がAアレルに対するよりもGアレルに対してより強固に結合したことを示す。実験は3回行い同様な結果を得た。この結果はこの領域に結合することによってLT- $\alpha$ の転写を制御する一つ又はそれ以上の核抽出物における未同定の分子が心筋梗塞に関連しているかもしれないことを示す。

#### 【0057】

実施例4 (LT- $\alpha$ タンパク質内のT26N変異による接着分子の誘導)

## (1) 実験方法

L T- $\alpha$  産物は、その炎症プロセスへの寄与のように、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、及び種々の白血球から接着分子及びサイトカインを誘導することができる (Ross, R., N.Engl.J.Med., 340, 115-126, 1999; Ware, C.F., et al., Curr.Top. Microbiol.Immunol., 198, 175-218, 1995)。これらの生物学的活性が遺伝子産物におけるアミノ酸置換によって影響されるかどうかを調べた。コドン 26 における SNP はスレオニンからアスパラギンへのアミノ酸変化をもたらす。従って、各アレル (26 N-L T- $\alpha$  は 26 T-L T- $\alpha$ ) について接着分子及びサイトカインの発現を誘導する能力を培養したヒト冠状動脈血管内皮細胞 (H C A E C) 及びヒト冠状動脈平滑筋細胞 (H C A S M C) を用いて次のようにして調べた。

まず、精製した大腸菌由来組み換え体 26 N-L T- $\alpha$  及び 26 T-L T- $\alpha$  を pET43 system (Novagen) を用いて調製した。H C A E C 及び H C A S M C (Bi oWhittaker, Inc.) を 5ng/ml の L T- $\alpha$  タンパク質 (26 N-L T- $\alpha$  又は 26 T-L T- $\alpha$ ) で 4 時間処理した。全 RNA をトリゾール (Life Technologies) を用いて単離した。cDNA を 2 $\mu$ g の全 RNA から d T15 プライミングによって調製し、SuperScript 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて合成した。mRNA を QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN) 及び ABI Prism 7700 sequence detector (Applied Biosystems) を用いて定量した。各試験は 3 回繰り返えし、各試料は三重に試験した。

【0058】

## (2) 実験結果

変異タンパクである 26 N-L T- $\alpha$  は 26 T-L T- $\alpha$  よりも H C A S M C において血管細胞接着分子-1 (V C A M-1) 及び E-セレクトイン mRNA について 2 倍高い転写活性レベルを示した (図 4)。

【0059】

## 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN et al.



<120> Method for judging inflammatory diseases

<160> 8

<130> A21492A

<170> PatentIn Ver. 2.1

【 0 0 6 0 】

<210> 1

<211> 162

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
aggggctccg cacagcaggt gaggtctctc tgccccatct ccttgggctg cccgtgcttc 60
gtgctttgga ctaccgcca gcagtgtcct gccctctgcc tgggcctcgg tccctcctgc 120
acctgctgcc tggatccccg gcctgcctgg gcctgggcct tg                               162
```

【 0 0 6 1 】

<210> 2

<211> 287

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
gtgggtttgg ttttggtttc cttctctgtc tctgactctc catctgtcag tctcattgtc 60
tctgtcacac attctctgtt tctgccatga ttctctcttg ttcccttcct gtctctctct 120
gtctccctct gctcaccttg gggtttctct gactgcatct tgtccccttc tctgtcgatc 180
tctctctcgg gggtcggggg gtgctctctc ccagggcggg aggtctgtct tccgccgcgt 240
gccccgcccc gctcactgtc tctctctctc tctctctttc tctgcag                               287
```

【 0 0 6 2 】

<210> 3

<211> 107

<212> DNA

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

ggggctccct ggtgttggcc tcacaccttc agctgcccag actgcccgtc agcaccctaa 60  
gatgcatctt gccacagca cctcaaacc tgctgtcac ctcatg 107

【 0 0 6 3 】

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 634

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

caacctgtgt tgggaaaaga gcattctggg cttaattcta aactaactct ctacctttct 60  
ctctctctcc accatcccgc cccctcccct gcctcccgtt gttaacatct ccatcttttt 120  
ctacatattt ctcaagtcca aatttttgca tctcacttgc cccatcctac gatagtcttc 180  
ttccgtcttt tgtctgtatt tttcttttt tttgatctgt cctgtttgtt gtcccactgt 240  
ggtttttggt tttgttttcc atgtttaatg tgatttttat cctgtcttta tctcctctat 300  
tttctctgtc ttctcatctt ttcgtccatc actgaacat ctctctctc tgccaagtta 360  
gaggaggcgg gaaaaaacct ccaaataact ctcttttctc cctcccctcc cctcgctcc 420  
ttttcctcgc ctccagtcca gtcttctggg ttcagacggc ccctttaatt taagttccct 480  
agtttccctt gggagatctg gccaagaact acccggtcgg ggcggaacga catccggtta 540  
cgccccctac agttcacttc cgtcctccac ctgcgtctct gcttgcgcca tttcctccag 600  
cctggagtgt ctccgccctt cccgcctccc gtct 634

【 0 0 6 4 】

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1250

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

tgagatatgt tgctttgctt cgcttctgtc aataagatga gaataacggt acctactcct 60  
tagtattaaa tgattaagta tgttaacagg gagagggcca aacgtttgtt gttttattac 120  
acagcaggac atcaggtctt actttttag ctccccatct caaagacggg gatagcaa 180

gtttcattca ggaaaaaat ccaggttgaa caatggggct gttggggcgg ggccaagaac 240  
 attctgctcg aattaacagt attaatgggc cgggcgcggt ggctcacgcc tgtaatccca 300  
 gcactctggg aggccgaagt gggtaggatca cctgagggtc tacatgggtg aagccccgtc 360  
 tctactaaaa aaacaaaaat ttgctgggcg tggtaggcggg cgcctgtaat cctagctact 420  
 cgggaggctg aggcaggaga atcgcttgaa cccgggaagc agcggttgca gtgagccgag 480  
 atcaggacat tgcactcccg cctgggcgac agggcgagac tctgtctcaa aacaaaaaca 540  
 aaaacagtat taatggaatg tagtataacc ctcaagccct actattaaca cttggggccg 600  
 aatccagacc ccgtcttccc gctcggattc agaacacctt cctgactcac tggccctagg 660  
 gcatcagcta cctcggacag catccttttg ggaaaatacc gccaccagc cccacgactg 720  
 ggaaagagtc gggaaacacc cccgagcaat ccagttccct gagacttccc tcctccctcc 780  
 cctcagctag ggcctgccgg ttcctagtgc gtgccagca gtcctcaggt cacccttact 840  
 accgggccaa ggaccccgtg ggaactcgca gccttcgcca cactcgttcc tcgcgcatcc 900  
 atggaggggt gcctacagag aagacctgcg tggcaaaaac ctaaacgaag agatgagggg 960  
 catggagagg agtaggataa gagaataaag ataacagtgg gggggagacg ttagtttcct 1020  
 ttatatcttt tgttactggc ggtagcagtg aagttagaaa cggttttaaa acaaatttca 1080  
 gacaggcatt ttccaaaggc aagcctggag cgcacggatc tgtataaccg cggaaggccc 1140  
 tgtttccggt cccttgcgcc tgcgctcttg cagccaagaa ggcgggaggc tggagtagag 1200  
 ggaagcctgc aaccggaagt gaaggcagat ttcctcctt cgtcgctgtt 1250

【 0 0 6 5 】

<210> 6

<211> 1386

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gccccatctc cttgggctgc ccgtgcttcg tgctttggac taccgcccag cagtgtcctg 60  
 ccctctgcct gggcctcggc cctcctgca cctgctgcct ggatccccgg cctgcctggg 120  
 cctgggcctt ggttctcccc atgacaccac ctgaacgtct cttcctccca aggggtgtgtg 180  
 gcaccacctt acacctctc cttctggggc tgctgctggc tctgctgcct ggggcccagg 240  
 ggctccctgg tgttggcctc acaccttcag ctgcccagac tgcccgtcag caccccaaga 300

tgcattcttg ccacagcacc ctcaaactg ctgctcacct cattggagac cccagcaagc 360  
agaactcact gctctggaga gcaaacacgg accgtgcctt cctccaggat gggtttctct 420  
tgagcaacaa ttctctcttg gtccccacca gtggcatcta cttcgtctac tcccaggtgg 480  
tcttctcttg gaaagcctac tctcccaagg ccacctctc cccactctac ctggcccatg 540  
agggtccagct cttctctctc cagtaccctt tccatgtgcc tctcctcagc tcccagaaga 600  
tggtgtatcc agggctgcag gaaccctggc tgcactcgat gtaccacggg gctgcgttcc 660  
agctcaccca gggagaccag ctatccaccc acacagatgg catccccac ctagtctctc 720  
gccctagtag tgtcttcttt ggagccttcg ctctgtagaa cttggaaaaa tccagaaaga 780  
aaaaataatt gatttcaaga ctttctcccc attctgcctc cattctgacc atttcagggg 840  
tcgtcaccac ctctcctttg gccattccaa cagctcaagt cttccctgat caagtcaccg 900  
gagctttcaa agaaggaatt ctaggcatcc caggggacca cacctccctg aaccatccct 960  
gatgtctgtc tggctgagga tttcaagcct gcctaggaat tcccagcca aagctgttgg 1020  
tctgtccac cagctaggtg gggcctagat ccacacacag aggaagagca ggcacatgga 1080  
ggagcttggg ggatgactag aggcaggagg gggactatct atgaaggcaa aaaaattaaa 1140  
ttatttattt atggaggatg gagagagggg aataatagaa gaacatccaa ggagaaacag 1200  
agacaggccc aagagatgaa gagtgagagg gcatgcgcac aaggctgacc aagagagaaa 1260  
gaagtaggca tgagggatca cagggcccca gaaggcaggg aaaggctctg aaagccagct 1320  
gccgaccaga gcccacacg gaggcattct caccctcgat gaagcccaat aaacctcttt 1380  
tctctg 1386

【 0 0 6 6 】

<210> 7

<211> 1459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccgagcttct taaacacagg ccttgggcta cggctctggg ggtacttggg ggggcggggg 60  
caggtctgat gagtaacccc tccccaggg ttccagagga agaagcctcc acatctgtct 120  
gccggcccaa gattccatg gcctccactt cccgccgcca acgccgagaa cgctcgtttc 180  
gtcgttactt gtctgcagga cggctgggtc gggcccaggc cctcctccag cgacaccag 240

gcctcgatgt agatgctggg cagccccac cactgcaccg ggcctgtgcc cgccacgatg 300  
 cccctgccct gtgcctgtcg ctteggtcg gggctgacc tgcccaccag gaccgccatg 360  
 gggacacggc actgcatgct gctgcccgc agggcccaga tgcctacacc gatttcttcc 420  
 tcccgtgct aagccgctgt ccctctgcc tgggaataaa gaataaggat ggggagacc 480  
 ctggccaaat tttgggctgg ggacccccct gggattctgc tgaagaggag gaagaagatg 540  
 atgcctcaa ggagcgggaa tggagacaga agctccaggg tgagctggag gacgagtggc 600  
 aggaagtcac ggggaggttt gaaggatg cctccatga aaccaggaa cctgagtcct 660  
 tctcagcctg gtcagatcgc ctggcccgg aacatgccca gaagtgccag cagcagcagc 720  
 gagaagcaga gggatcctgt cgacccccac gtgctgaggg ctccagccag agctggcgac 780  
 acgaggagga ggagcagcgg ctcttcaggg agcgagccc ggccaaggag gaagagctgc 840  
 gtgagagccg agccaggagg gcgcaggagg ctctagggga ccgagaacc aagccaacca 900  
 gggccgggccc cagggaagag caccacagag gagcggggag gggcagcctc tggcgatttg 960  
 gtgatgtgcc ctggccctgc cctgggggag gggaccaga ggccatggct gcagccctgg 1020  
 tggccagggg ccccccttg gaggaacagg gggctctgag gaggtacttg aggttccagc 1080  
 aggtccgctg gcaccctgac cgcttcctgc agcgattccg aagccagatt gagacctggg 1140  
 agctgggccc tgtgatggga gcagtgcag ccttttctca ggccctgaat cgccatgcag 1200  
 aggccctcaa gtgaccctag ggaagaagca agaaacttcg gggctgcagc ctccagatga 1260  
 ggcagaagga agggtaagg aaaggatggg gaccacaagg aagagccagg tgctgctcag 1320  
 cagaggatat ggggtgggagc gaaagtgtgta acaagtgggg gtgggggggt cgggccgcca 1380  
 ccaactgtcc ttgactctgc cgtttcctaa taagacctgg ttccacatct caaaaaaaaa 1440  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1459

【 0 0 6 7 】

<210> 8

<211> 1854

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acaggcattt tcaaaggca agcctggagc gcacggatct gtataaccgc ggaaggccct 60  
 gtttccggtc ccttgccct gcgctcttgc agccaagaag gcgggaggct ggagtagagg 120

gaagcctgca accggaagtg aaggcagatt tccctccttc gtcgctgttg ctgccgccat 180  
acgcgctctc cctgttttagc tcttctgtta gaaatagtat ctttgtttcc ctttgctgtt 240  
cctcaatccc ctactcttca ccccttgttt tcacctattt tgcgagaacc catccagatc 300  
ccccttccct tcttcccctg cgggccagat tatggcagag aacgatgtgg acaatgagct 360  
cttggactat gaagatgatg aggtggagac agcagctggg ggagatgggg ctgaggcccc 420  
tgccaagaag gatgtcaagg gctcctatgt ctccatccac agctctggct ttcgtgactt 480  
cctgctcaag ccagagttgc tccgggccat tgtcgactgt ggctttgagc atccgtcaga 540  
agtccagcat gagtgcattc ctcaggccat tctgggaatg gatgtcctgt gccaggccaa 600  
gtcgggcatg ggaaagacag cagtgtttgt cttggccaca ctgcaacagc tggagccagt 660  
tactgggcag gtgtctgtgc tggatgatgt tcacactcgg gagttggctt ttcagatcag 720  
caaggaatat gagcgcttct ctaaatacat gcccaatgtc aaggttgctg ttttttttgg 780  
tggctctgtc atcaagaagg atgaagaggt gctgaagaag aactgcccgc atatcgctgt 840  
ggggactcca ggccgtatcc tagccctggc tcgaaataag agcctcaacc tcaaacacat 900  
taaacacttt attttggatg aatgtgataa gatgcttgaa cagctcgaca tgcgtcggga 960  
tgtccaggaa atttttcgca tgacccccca cgagaagcag gtcattgatg tcagtgttac 1020  
cttgagcaaa gagatccgtc cagtctgccg caagttcatg caagatccaa tggagatctt 1080  
cgtggatgat gagacgaagt tgacgctgca tgggttgagc cagtactacg tgaaactgaa 1140  
ggacaacgag aagaaccgga agctctttga ccttctggat gtccttgagt tcaaccaggt 1200  
ggtgatcttt gtgaagtctg tgcagcgggt cattgccttg gccagctac tagtggagca 1260  
gaacttccca gccattgcca tccaccgtgg gatgccccag gaggagaggc tttctcggta 1320  
tcagcagttt aaagattttc aacgacgaat tcttgtggct accaacctat ttggccgagg 1380  
catggacatc gagcgggtga acattgcttt taattatgac atgcctgagg attctgacac 1440  
ctacctgcat cgggtggcca gagcaggccg gtttggcacc aagggttgg ctatcacatt 1500  
tgtgtccgat gagaatgatg ccaagatcct caatgatgtg caggatcgct ttgaggtcaa 1560  
tattagttag ctgcctgatg agatagacat ctctcctac attgaacaga cacggtagaa 1620  
gactcgccca ttttggaatg tgaccgtctg tccttcagga gaggacacca ggggtgggggt 1680  
gaaggagaca ctactgcccc caccctgac agccccacc ccatggcttc catcttttgc 1740  
atcaccacca ctctgaacc cccatttctg atttgtcaga attttttttt aacaaaacta 1800  
aaaatgaaac acatgtgtct gtggtatcta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1854

【0068】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、心筋梗塞を初めとする炎症性疾患の発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断を正確にかつ迅速に行うことができる。

【0069】

【図面の簡単な説明】

【図1】 LT- $\alpha$  遺伝子座を含む 130 kb のゲノム領域における連鎖不平衡を示す。

上: 各遺伝子におけるゲノタイプされた SNPs の数を表す転写マップ。

下: 本領域における D' の分布。D' は LT- $\alpha$  のイントロン 1 内の SNP 対他の SNP で示す。

【図2】 図2 (A) は LT- $\alpha$  のイントロン 1 (252 A>G)、図2 (B) は IKBL のプロモーター領域 (-63 T>A) 内の SNP による転写制御活性をそれぞれ示す。\* 10 G-252 A と 10 A-252 G との間の比較において  $p < 0.01$ : \*\* -63 A アレルと -63 T アレル間の比較において  $p < 0.01$  (student's t test)。

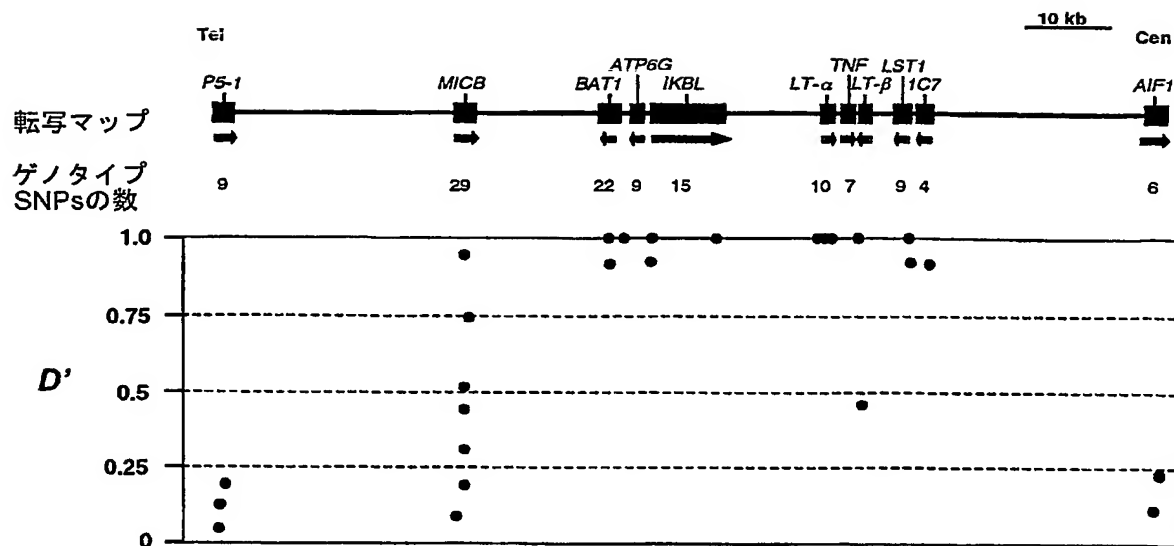
【図3】 LT- $\alpha$  のイントロン 1 に対する未知の核因子の結合を示す。矢印は核因子の G-アレルに対するより強い結合を示すバンドである。

【図4】 図4 (A) は、HCASMC のみを培養した場合 (白色バー)、HCASMC を 26 T-LT- $\alpha$  (灰色バー) 又は 26 N-LT- $\alpha$  (黒色バー) (5 ng/ml) を用いて 4 時間処理して培養した場合の VCAM-1 の相対的な mRNA 発現量をそれぞれ示す。図4 (B) は、HCASMC のみを培養した場合 (白色バー)、HCASMC を 26 T-LT- $\alpha$  (灰色バー) 又は 26 N-LT- $\alpha$  (黒色バー) (5 ng/ml) を用いて 4 時間処理して培養した場合の E-セレクトインの相対的な mRNA 発現量を示す。結果は平均値  $\pm$  S.D. (n=3、\* $p < 0.01$ 、\*\* $p < 0.05$  対 26T) を示す。

【書類名】

図面

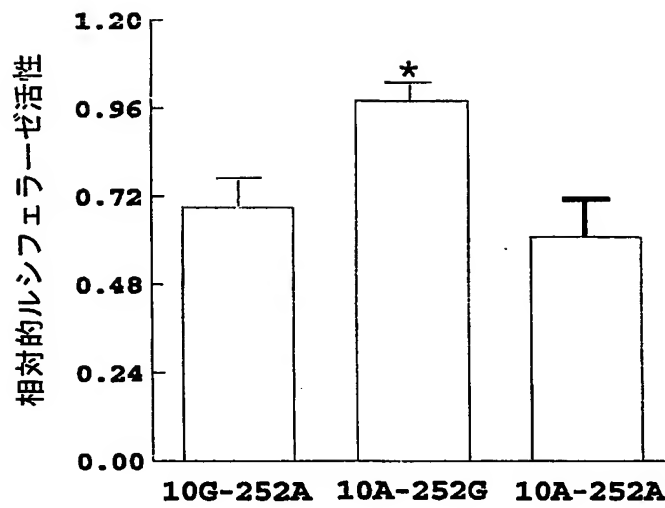
【図 1】



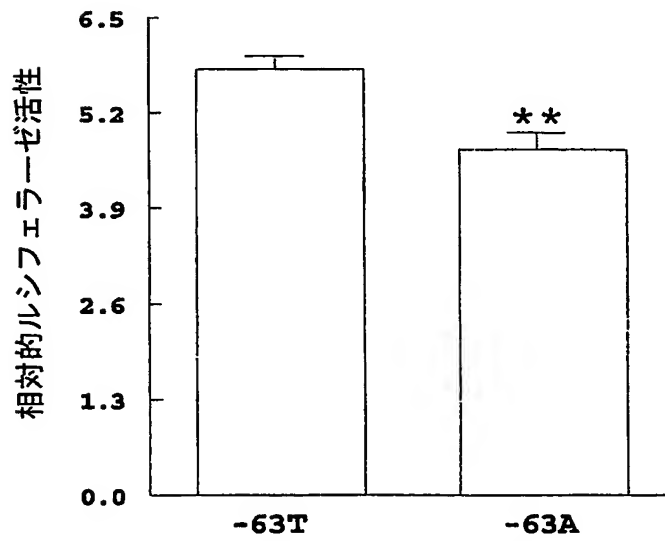


【図 2】

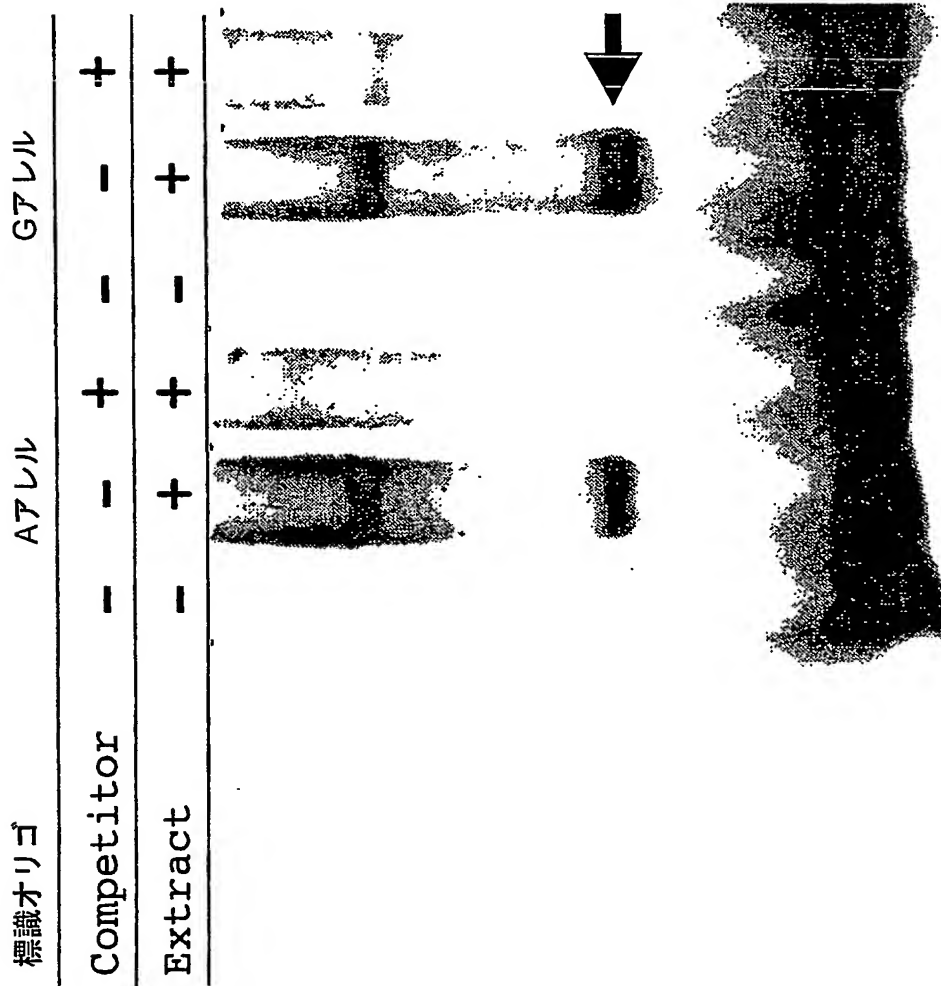
A



B

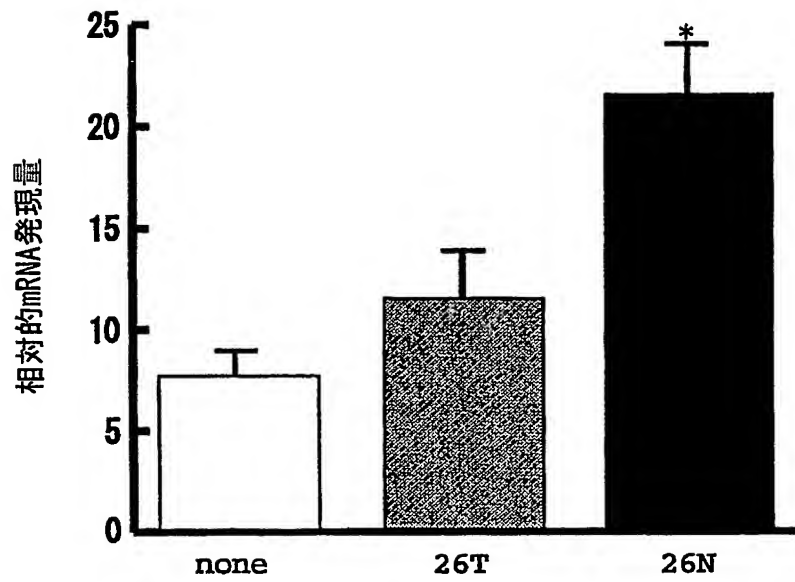


【図3】

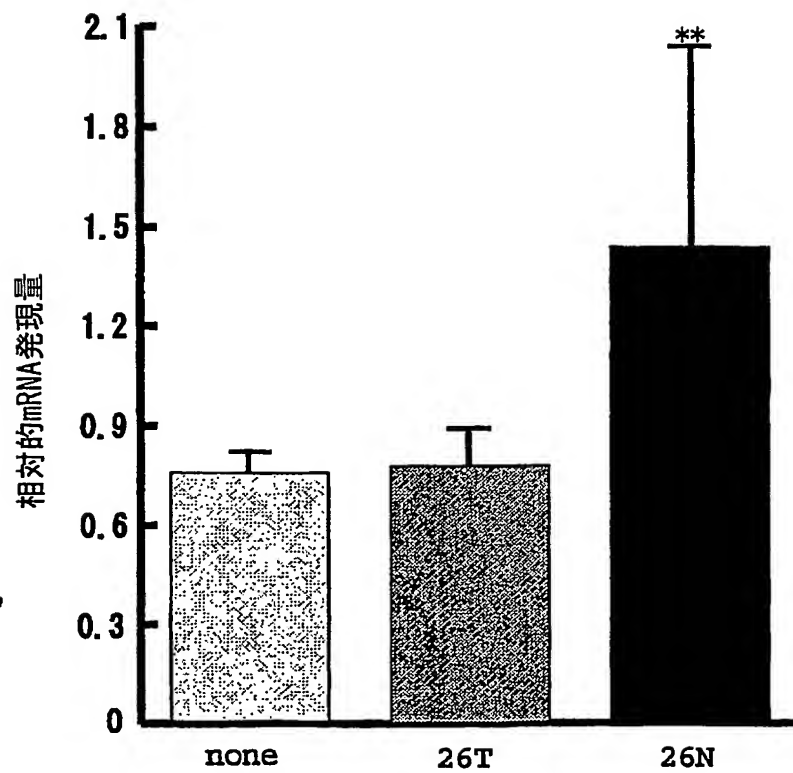


【図 4】

A



B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 心筋梗塞と関連性のある一塩基多型 (SNIPs) を同定し、これらのSNIPsを利用して心筋梗塞をはじめとする炎症性疾患を判定する。

【解決手段】 リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用。

【選択図】 なし

特願 2002-231532

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏 名

理化学研究所

特願2002-231532

出願人履歴情報

識別番号

[502288263]

1. 変更年月日

2002年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区三田1-5-6-801

氏 名

田中 敏博

特願2002-231532

出願人履歴情報

識別番号

[502288171]

1. 変更年月日

2002年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都目黒区八雲3-29-13-2号

氏 名

大西 洋三

特願 2002-231532

出願人履歴情報

識別番号

[502288182]

1. 変更年月日

2002年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区恵比寿 3-36-13-307

氏 名

尾崎 浩一



特願 2 0 0 2 - 2 3 1 5 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 1 0 0 2 4 8 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 2 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県川崎市中原区田尻町 2 1

氏 名

飯田 有俊

特願 2002-231532

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502288193]

1. 変更年月日

2002年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府吹田市山田丘2-2 大阪大学大学院病態情報内科学

氏 名

堀 正二